

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21720091152143

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

特异生境放线菌的选择分离及新种鉴定

Selective Isolation of Actinomycetes from Special Habitat
and a New Strain Identification

徐 祯

指导教师姓名: 黄耀坚 教 授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2012 年 月 日

论文答辩时间: 2012 年 月 日

学位授予日期: 2012 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

中文摘要	I
英文摘要	III
1 前言	1
1.1 植物根际微环境对放线菌多样性的影响	1
1.2 稀有放线菌资源的研究进展	1
1.2.1 稀有放线菌的分类情况	1
1.2.2 稀有放线菌的研究意义	2
1.3 放线菌基因筛选的研究进展	5
1.3.1 安莎类化合物的结构及生物活性	5
1.3.2 安莎类抗生素的生物合成	6
1.3.3 平板影印法	6
1.4 放线菌多相分类研究进展	8
1.4.1 系统发育信息	8
1.4.2 形态、生理、化学分类信息	10
1.4.3 基因型信息	13
1.5 本课题研究的目、意义及内容	16
2 材料与方法	18
2.1 材料	18
2.1.1 植物根际土壤样品来源	18
2.1.2 稀有放线菌分离材料	19
2.1.3 基因筛选材料	20
2.1.4 多相分类材料	20
2.1.5 常用试剂及耗材	25
2.1.6 主要仪器	27
2.2 方法	27
2.2.1 稀有放线菌的分离、培养及发酵粗提物的制备	28
2.2.2 高通量基因筛选技术路线	32
2.2.3 生物活性测定	34
2.2.4 多相分类研究	35
3 结果与分析	48
3.1 聚乳酸(PLA)-明胶培养基的选择分离效果	48
3.2 稀有放线菌的分类鉴定	52
3.3 3-氨基-5-羟基苯甲酸合酶基因阳性菌株高通量筛选结果	55
3.3.1 平板影印率	55
3.3.2 3-氨基-5-羟基苯甲酸合酶阳性菌株鉴定	56
3.3.3 阳性菌株代谢物的化学分析	57
3.4 植物根际土壤放线菌分离株的抗菌抗肿瘤活性	58

3.5 菌株 XMU 198 多相分类鉴定	62
3.5.1 16S rRNA 鉴定结果	63
3.5.2 基于 <i>gyrB</i> 基因遗传距离计算结果	64
3.5.3 形态特征	66
3.5.4 培养特征	67
3.5.5 生理生化特征	68
3.5.6 细胞化学组分	69
3.5.7 DNA (G+C) mol% 测定	72
3.5.8 DNA 同源性测定	72
3.5.9 菌株 XMU 198 描述	73
4 讨论与结论	75
4.1 聚乳酸 (PLA)-明胶是稀有放线菌良好的选择培养基	75
4.2 平板影印-PCR 法用于 AHBAs 产生菌的高通量筛选	76
4.3 韩国生工菌属遗传多样性分析	77
4.4 放线菌的多相分类技术	78
5 结论与展望	80
5.1 主要研究结果	80
5.2 展望	80
6 参考文献	82
7 攻读硕士学位期间发表论文	89
8 致谢	90
9 附录	91

Catalogue

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	III
1 Introduction.....	1
1.1 Actinomycete biodiversity of rhizosphere.....	1
1.2 Resources of rare actinomycetes	1
1.2.1 Classification of actinomycetes.....	1
1.2.2 The prospect of study on rare actinomycetes.....	2
1.3 Progress in the gene-mining method.....	5
1.3.1 Structure and bioactivity of ansamycin	5
1.3.2 Biological synthesis of ansamycin	6
1.3.3 Replica plating method.....	6
1.4 Progress in polyphase study of actinomycete.....	8
1.4.1 Phylogenetic information	8
1.4.2 Morphological, physical, chemical classification information.....	10
1.4.3 Genotype information.....	13
1.5 Purpose, contents and significance of this thesis	16
2 Materials and Methods	18
2.1 Materials	18
2.1.1 The source of rhizosphere soil samples	18
2.1.2 Materials of rare actinomycete isolation.....	19
2.1.3 Materials of gene mining	20
2.1.4 Materials of polyphase sorting	20
2.1.5 Reagents and other materials	25
2.1.6 Apparatus	27
2.2 Methods.....	28
2.2.1 Isolation, cultivation and extraction of rare actinomycetes	28
2.2.2 Technique line of high throughput selection.....	32
2.2.3 Biological activity test	34
2.2.4 Polyphase study	35
3 Result.....	48
3.1 Isolation effect of rare actinomycete	48
3.2 The diversity of rare actinomycete.....	52
3.3 Result of high throughput isolation of AHBAs positive strains	55
3.3.1 Identification of 16S rRNA and AHBAs gene	55
3.3.2 Result of chemical analysis.....	56
3.3.3 Chemical analysis of AHBAs positive strains.....	57
3.4 Biological activity test of rare actinomycete	58

3.5 Classification and Identification of XMU 198	62
3.5.1 Result of 16S rRNA analysis	63
3.5.2 <i>gyrB</i> gene-based genetic distance caculation	64
3.5.3 Morthological features.....	66
3.5.4 Culture features	67
3.5.5 Physiological and biochemical characteristics.....	68
3.5.6 Cell chemical component.....	69
3.5.7 Determination of (G+C) mol%	72
3.5.8 Determination of DNA homology	72
3.5.9 Description of strain XMU 198.....	73
4 Discussion and Conclusion	75
4.1 Isolation effect of Poly lactide and Humic-acid vitamin medium	75
4.2 The feasibility and priority of high throughput method	76
4.3 The analysis of the diversity of <i>Kribbella</i>	77
4.4 Polyphasic taxonomy technology	78
5 Conclusion and Prospect.....	80
5.1 Conclusion.....	80
5.2 Prospect	80
6 Reference	82
7 Publication.....	89
8 Acknowledgements	90
9 Appendix.....	91

中文摘要

放线菌的次级代谢产物是一类重要的微生物药物资源。近年来,选择性分离放线菌的方法学研究取得了显著成绩。基因筛选、培养基筛选、原位筛选等成为当今研究的重要方法。虽然这些分离方法出发点不同,但是它们都为放线菌的新药发现提供了宝贵的菌种资源。

本论文以厦门、云南、青海三地的植物根际土壤样品作为实验材料,采用了聚乳酸(Poly(L-lactide))(PLA)-明胶培养基用于稀有放线菌的分离。通过选择分离能力的比较发现,聚乳酸(PLA)-明胶培养基比腐殖酸培养基有更好的选择分离效果。利用聚乳酸(PLA)-明胶培养基从 11 份根际土壤中总共分离得到 85 株放线菌,根据 16S rRNA 鉴定获得除链霉菌属之外的稀有放线菌 71 株,稀有放线菌占有所有分离菌株的 83%,分布于 8 个属中:马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)48 株,野野村氏菌属(*Nonomuraea*)15 株,假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)3 株,壤霉菌属(*Agromyces*)1 株,韩国生工菌属(*Kribbella*)1 株,伦茨氏菌属(*Lentzea*)1 株,链孢囊菌属(*Streptosporangium*)1 株,球孢囊菌属(*Sphaerisporangium*)1 株。同一批土样的腐殖酸培养基总共分离得到 78 株放线菌,其中稀有放线菌数为 7 株,稀有放线菌数仅占总菌数的 9%,分布 4 个属中。实验结果表明,聚乳酸(PLA)-明胶培养基是一种分离马杜拉菌属等土壤稀有放线菌的良好选择培养基。

本文还发明了一种将平板影印技术与 PCR 扩增技术相结合从土壤中快速获得具有安莎类抗生素产生潜力的放线菌的方法。根据安莎类抗生素合成途径中的 3-氨基-5-羟基苯甲酸合酶(AHBAs)基因的保守性,通过放线菌的培养、影印、AHBAs 基因的 PCR 扩增,从 33 份土样中获得 8 株 AHBAs 阳性菌株。通过化学检测方法,Xzqh-8 菌株的代谢产物具有同格尔登霉素化合物同样的颜色反应。平板影印与 PCR 技术结合的基因筛选,可作为某些特殊代谢特征的放线菌早期鉴别的有效筛选方法。

本论文还对 1 株韩国生工菌属(*Kribbella*)的稀有放线菌进行了形态特征、培养特征、生理生化特性、化学分类和分子系统学研究。从表型、基因型和系统发育三个层次比较分析,最终确定实验菌株的分类地位。菌株 XMU 198 为韩国

生工菌属内的一个新物种，命名为厦门韩国生工菌(*Kribbella amoyensis*)。该鉴定结果已经在线发表于国际系统分类学杂志 IJSEM 上(International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, doi: 10.1099/ijs.0.033290-0)。

关键词：稀有放线菌；基因筛选；聚乳酸(Poly (L-lactide))；活性测定；多相分类

英文摘要

Abstract

There are many nature products were separated from actinomycetes. Nature products are the major source of clinical medicine, so actinomycetes' secondary metabolites have been considered as important microorganism resources. Lately, selective isolation methods have made great progress, especially in methods of gene-mining, selective media, screening in situ and so on. Although all these methods have different starting point, they all provide valuable resources of compounds for new drug discovery.

In this study, all rhizosphere soil samples used for isolation of actinomycetes were isolated from Xiamen city, Yunnan province and Qinghai province. The selective isolation of actinomycetes was achieved by gene-mining and selective media methods. Compared Poly (L-lactide)-gelatin (PG) medium with Humic acid-Vitamin (HV) medium, the isolation effect of PG medium is much better than HV medium. There were 85 strains of actinomycetes were isolated from 11 soil samples with PG medium, and the 16S rRNA result showed that 71 (83%) of them belongs to rare actinomycete. All of these rare actinomycetes belongs to 8 genus, including *Actinomadura* (48 strains), *Nonomuraea* (15 strains), *Pseudonocardia* (3 strains), *Agromyces* (1 strain), *Kribbella* (1 strain), *Lentzea* (1 strain), *Streptosporangium* (1 strain) and *Sphaerisporangium* (1 strain). There were 78 actinomycetes isolated from HV medium with the same 11 soil samples. However, only 7 rare actinomycetes were isolated, the rest of them belong to *streptomycetes*. The 7 rare actinomycetes were classified into 4 genus, including *Micromonospora* (4 strains), *Kitasatospora* (1 strain), *Agromyces* (1 strain), *Nonomuraea* (1 strain).

In this study, a high throughput method for the gene mining of AHBA synthase gene from soil actinomycetes was introduced. AHBA synthase (AHBAs) is highly conservative. Through soil actinomycetes culture, colony replica plating, PCR

amplification of AHBAs genes, isolation of positive strains and characterization of fermentation extracts, eight AHBAs positive strains were selected from 33 plants rhizosphere soil samples. In particular, the color change of Xzqh-8 was identical to the positive control geldanamycin.

In this study, one *Kribbella* isolate had been identified systematically by morphology, cultural characteristics, physiological, biochemical tests and molecular systematic analysis. The taxonomy status of the isolate was finally determined from three levels including phenotypic, genetic and phylogenetic characteristics. The strain XMU 198 was named as *Kribbellla amoyensis*, which is a novel species of genus *Kribbella*. It is published on International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (doi: 10.1099/ij.s.0.033290-0).

Key words: rare actinomycetes; gene-mining; Poly (L-lactide); bioactivity; polyphase sort.

1 前言

1.1 植物根际微环境对放线菌多样性的影响

植物根际土壤是微生物栖息的一个重要微环境，它由植物、土和微生物共同作用，微生物类群的多样性对于维持土壤健康具有重要的作用。因为根际微生物可以将土壤中的毒素移除，对 C 元素循环、固氮、磷酸化等都具有十分重要的作用^[1]。在与植物根际相互作用过程中，土壤微生物使得不同植物根际土壤酸碱度出现细微差异，进而影响微生物群落组成^[2]。有研究表明植物根际土壤微生物的多样性大于非植物根际土壤^[3]。

放线菌作为微生物的一大类群，在植物根际土壤微生物类群中也占有极为重要的地位。在农作物玉米根际土壤中，放线菌是仅次于变形杆菌的第二大类群^[1]。同时，放线菌对于抑制植物根际有害细菌生长和调节植物根际微环境起到十分重要的作用。选用植物根际土壤样品不仅能够提供丰富的微生物资源，而且可以分离得到某些能够产生抗菌、抗肿瘤或其它生物活性物质的菌株。

1.2 稀有放线菌资源的研究进展

1.2.1 稀有放线菌的分类情况

放线菌门属于原核生物界细菌域，仅有放线菌纲一个纲，放线菌纲包含放线菌目和双歧杆菌目，其中，放线菌目包括 40 多个科约 170 多个属。放线菌因其菌落呈放射状而得名，它们的主要特征包括(G+C)mol%在 50 以上的革兰氏阳性细菌；16S rRNA 全序列能够将放线菌门与其它细菌门分开；放线菌门既包括具有球状简单形态的低等放线菌，也包含有发达菌丝，孢子链，孢囊等高度形态分化的高等放线菌^[4]。

稀有放线菌是指那些通过常规分离方法得到的频率远低于链霉菌属放线菌的菌株^[5]。目前常规方法分离得到的放线菌 95%属于链霉菌属，其它菌属的菌株仅占 5%左右。目前，有效描述的种大约 2000 个，其中链霉菌属的有 500 多个，占了很大比例，因此，链霉菌被称为常见放线菌，而其它属的放线菌被统称为稀

有放线菌^[4]。

放线菌的分类经历了若干个阶段,并从中不断完善。从一开始的只根据形态、培养和生理生化特征到现在根据 16S rRNA、DNA 杂交和系统发育树的构建等分子分类方法,使得放线菌门不断壮大。现代放线菌分类的核心是依靠 16S rRNA 相似度来进行判断。16S rRNA 序列必须大于 1400 个碱基,当其相似性大于 99%,则是已知种或相近种的可能性很大,相似性小于 98%,是新种的可能性很大。如果菌株的 16S rRNA 与该属相近模式种的相似度均低于 97%,则基本可以确定为新种,若大于 97%,则应该通过 DNA 杂交的方法进行进一步的确认^[4]。随着分子分类学方法的发展, Meyers 在 2009 年提出基于 *gyrB* 基因遗传距离的大小来判断是否为新种^[6]。

1.2.2 稀有放线菌的研究意义

对于稀有放线菌的研究是十分有意义的。它的意义表现在以下 2 个方面,一是虽然近些年放线菌门不断壮大,但是限于当前分离培养条件、技术和方法的限制,环境中只有极少一部分放线菌被人类分离纯化,这些分离得到的放线菌不到自然界放线菌总量的 10%。而在这 10% 中,链霉菌又占据绝对优势,稀有放线菌稀缺由此可见^[4]。

其次,稀有放线菌资源为人类探索发现新的生物活性化合物提供了无可替代的宝库。自从人们发现了链霉菌,新型抗生素的发现进入了一个新的纪元,大量的新型抗生素被分离得到,这其中包括氯霉素、四环素类抗生素、大环内酯类抗生素等。随着越来越多的抗生素被发现,在非稀有放线菌中寻找新型抗生素变得越来越困难,因此,人们开始探索稀有放线菌资源,例如:马杜拉放线菌属、拟无枝菌酸菌属、小单孢菌属等^[7]。

近些年来,科研工作者不断探索能够分离稀有放线菌的方法,并且取得了较为丰硕的成果,从高氏一号培养基到腐殖酸培养基,分离菌株的种属也从链霉菌属逐步扩展到各个稀有放线菌属中。

腐殖酸类物质(Humic Acids Substances, 简写HAS)是自然界生物(包括植物、动物、微生物)活动和大自然生态发展的必然产物,是动植物残体经过微生物的一系列分解和合成而形成的一类有机高分子化合物,包括腐殖酸、黄腐酸和胡敏

素等。腐殖酸是土壤中有机成分的主要组成部分。因为腐殖酸在土壤化学反应中起着关键作用，所以它被认为在陆地生态系统中起着非常重要的作用^[8]。

腐殖酸是大分子物质，所以无法直接被微生物利用。然而腐殖酸可以和金属离子、有机化合物、毒物相互作用，形成更加容易被利用的化合物。通过形成这些化合物的过程，腐殖酸可以将金属溶解、移动到水体当中，从而可以将土壤中的有害物质移除，从而消除土壤中的污染物；腐殖酸还可以溶解有机物质，储存在土壤之中，增加可利用有机物的含量，使之更加容易被利用；腐殖酸还可以保护微生物、植物免受紫外线、机械压力、污染、干旱的伤害，同时它还可以促进植物的根、茎、叶的生长^[9]。腐殖酸类物质中含有羧基、羟基、醇羟基、烯醇基、磺酸基、氨基、醌基、羰基、甲氧基等多种活性基团，具有弱酸性、胶体吸附、离子交换、络合、螯合、表面活性与化学反应等性能，并能给微生物提供足够的碳、氮元素，改善微生物的生活环境，促进微生物的代谢活动和生长发育，增强微生物的活性^[9, 10]。

Masayuki Hayakawa于1987年介绍的HV培养基，它将humic acid (HA)作为唯一碳源、氮源，有效的抑制了细菌的生长，同时还能够分离得到链霉菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、小双孢菌属(*Microbispora*)、链孢囊菌属(*Streptosporangium*)等属的菌株。至今已成为一个十分经典的培养基，被广泛使用^[11]。之后又衍生出Coal & Vitamin agar(CV)培养基，它将腐殖酸改变为炭素作为碳氮源，也取得了不错的分离效果^[12]。

聚乳酸(PLA)属于可降解塑料，是用玉米淀粉、树薯粉或者甘蔗为原料制成。它在阳光下就可以分解，属于可降解性材料。聚乳酸(PLA)是由乳酸(lactic acid)分子聚合而成，2个乳酸分子通过酯化并催化成环二乳酸酯(图 1.1)，环二乳酸酯开环后聚合生成 PLA。乳酸分子有左旋(L- lactides)和右旋(D-lactides)2种,但是鉴于右旋乳酸分子的聚合物是不定型的，所以通常所说的 PLA 均是左旋聚合物^[13]。

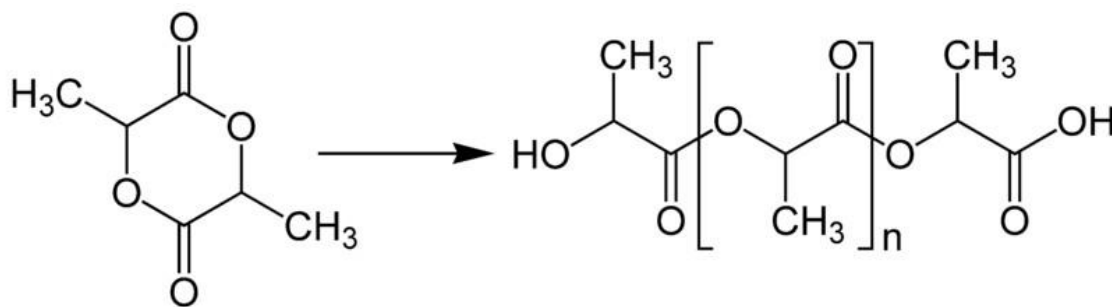


图 1.1 2 个乳酸分子通过酯化形成环二乳酸酯

Fig 1.1 Two lactic acid molecules formed two lactic acid ester

聚乳酸（PLA）在60-65℃将由高弹态转变成玻璃态，它的熔点在173-178℃之间。聚乳酸纤维由于强度高，有极好的悬垂性、回弹性和手感，良好的吸湿性、生物可降解性、抗皱性及抗紫外线和阻燃功能，鉴于PLA的性质，它广泛应用于各个领域。它可以作服装面料、装饰材料、医疗卫生材料、农膜材料、包装材料等。聚乳酸纤维悬垂性、舒适性、抗皱性良好，且具有好的快干效应，适合于军装、内衣及运动衫等；聚乳酸纤维稍呈酸性的pH 值，与人体皮肤相同，具有优良的生物相容性，同时，它还具有生物降解性和安全性，可以制成手术缝合线、骨内固定装置、人工肌腱韧带等；聚乳酸树脂还可以用来生产包装袋、食品袋等。聚乳酸在土壤微生物以及光照等共同作用下降解成二氧化碳和水，不会污染环境^[14]。

能够降解 PLA 的微生物主要集中在假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、拟无枝菌酸菌属(*Ameycolatopsis*)、伦茨氏菌属(*Lentzea*)、拟孢囊菌属(*Kibdelosporangium*)和相近菌属中，1999 年 Pradamuda、Ikura 利用乳化 PLA 的方法，分离得到若干可以降解 PLA 的拟无枝菌酸菌属的菌株，这些菌株当中有若干可以产生透明圈，表明其可以利用 PLA^[15]。2001 至 2009 年间，又陆续发现小双孢菌属(*Microbispora*)、卓孢菌属(*Excellospora*)、糖丝菌属(*Saccharothrix*)及马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)也可以降解 PLA^[16-18]。Suyama et al.的 1998 年的文献指出 PLA 相对于 PHB、PCL 和 PBS 而言，较难被微生物分解^[19]。然而，Yutaka et al.(2005)年的研究表明当在 PLA 当中加入明胶后，其分解效率能够大幅度提高^[20]。

1.3 放线菌基因筛选的研究进展

放线菌的代谢产物是研发临床抗生素的主要来源,目前已知的具有生物活性的次级代谢产物约有半数来源于放线菌,这些具有生物活性的次级代谢产物包括:杀菌剂、肿瘤抑制剂和酶^[21]。在过去的 50 年中,为了新药的探索,人们投入了大量的精力在放线菌分离这一领域,其中通过传统筛选方法,从放线菌及真菌中分离获得许多天然化合物,并已研发成药物,广泛的用于临床治疗^[22],然而,传统的筛选方法已经无法满足当今人们对新型化合物探索的要求。

基因筛选相对于传统的筛选方法,更具有目的性,它能够筛选特定的抗生素产生菌。鉴于已经获得了很多抗生素合成基因的全序列,使得预测菌株是否具有特定抗生素产生潜力成为了可能^[23]。在过去的 10 年中,基因筛选技术获得了广泛的关注,并且成功的筛选到了很多具有价值的抗生素^[24-26]。

尽管基因扩增技术使得人们更加容易寻找目标抗生素产生菌,但在基因扩增前菌株的分离、纯化还无法实现高通量^[25-27]。针对这一问题,本文对基因扩增技术进行了改进,实现了高通量筛选。

1.3.1 安莎类化合物的结构及生物活性

安莎霉素(ansamycins)类抗生素是一类具有重要生物活性的大环内酰胺类化合物,因其芳香环不相邻两个位置之间通过酰胺键相连形成柄状结构而得名。它具有良好的抗菌,抗肿瘤和抗病毒活性,文献报道它们主要来源于植物或者微生物的代谢产物^[28,29]。安莎类抗生素在结构上具有相关性,均具有一个 I 型聚酮骨架,根据连接的芳香基团不同,可以分为苯醌型安莎和萘醌型安莎 2 类(图 1.2)。萘醌型安莎类抗生素(naphthalenic ansamycin)包括 rifamycin、naphthomycin、streptovaricin、tolypomycin 等,它们均具有抗菌生物活性;而苯醌型安莎类抗生素(benzene ansamycin)包括 geldanamycin、ansatrienin A、ansamitocin 等,它们已经从放线菌及高等植物中分离到,并显示了对真核细胞的细胞毒性作用及抗原虫、抗肿瘤及良好的抗病毒活性^[30]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库